

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **08-073504**(43)Date of publication of application : **19.03.1996**

(51)Int.Cl.

**C08B 37/00**  
**A23L 1/236**  
**A61K 47/36**  
**C12P 19/16**  
**C12P 19/18**  
**// A23L 1/307**

(21)Application number : **07-116583**(71)Applicant : **HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC**(22)Date of filing : **19.04.1995**

(72)Inventor : **BANDAI TAKAHIKO**  
**SHIBUYA TAKASHI**  
**SUGIMOTO TOSHIYUKI**  
**MIYAKE TOSHIO**

(30)Priority

Priority number : **06165815** Priority date : **27.06.1994** Priority country : **JP****(54) NONREDUCING SUGAR, ITS PRODUCTION, AND ITS USE**

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a nonreducing sugar having a trehalose structure at the molecular end and another one having a trehalose structure inside the molecule both in high yield.

**CONSTITUTION:** A nonreducing sugar or a low-reducing sugar contg. the same is produced by treating a soln. prepd. by liquefying starch with a nonreducing sugar synthase and a starch debranching enzyme and/or cyclomaltodextrin glucanotransferase or with a nonreducing sugar synthase, a trehalose liberating enzyme, and a starch debranching enzyme and/or cyclodextrin glucanotransferase.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-73504

(43)公開日 平成8年(1996)3月19日

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C08B 37/00		G 7433-4C		
A23L 1/236		A		
A61K 47/36		B		
		D		
C12P 19/16		7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-116583

(22)出願日 平成7年(1995)4月19日

(31)優先権主張番号 特願平6-165815

(32)優先日 平6(1994)6月27日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000155908  
株式会社林原生物化学研究所  
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72)発明者 万代 隆彦  
岡山県岡山市政津1428番地

(72)発明者 渋谷 孝  
岡山県総社市下原318番地

(72)発明者 杉本 利行  
岡山県岡山市東畦695番44号

(72)発明者 三宅 俊雄  
岡山市伊島町1丁目3番23号

(54)【発明の名称】非還元性糖質とその製造方法並びに用途

(57)【要約】

【目的】 末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、トレハロースの両グルコースに重合度1若しくは2以上のグルコースを有している非還元性糖質及びトレハロースなどの非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質とその製造方法並びに用途を提供する。

【構成】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させ、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質、該糖質の製造方法並びに該糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させ、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項2】 澱粉を液化した溶液が、濃度10w/w%以上の澱粉をDE15未満に液化した溶液である請求項1記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項3】 澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをグルコース重合度3以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼとともに作用させる請求項1又は2記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項4】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求項1、2又は3記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項5】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項4記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項6】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させて非還元性糖質を生成せしめ、これを採取することを特徴とする非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項7】 澱粉を液化した溶液が、濃度10w/w%以上の澱粉乳を酸又は酵素でDE15未満に液化した溶液である請求項6記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項8】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させ、更に必要に応じて、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させて非還元性糖質及び夾雑糖質含有溶液とし、これをカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させた非還元性糖質を採取することを特徴とする非還元性糖質、又は、これを含む低

還元性糖質の製造方法。

【請求項9】 カラムクロマトグラフィーが、塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーである請求項8記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項10】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させて非還元性糖質を製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをともに作用させて非還元性糖質を製造することを特徴とする非還元性糖質の増収方法。

【請求項11】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させ、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた組成物。

【請求項12】 得られる非還元性糖質が、カラムクロマトグラフィーにかけて含量を向上させた非還元性糖質である請求項11記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた組成物。

【請求項13】 非還元性糖質が、トレハロースの含水結晶又は無水結晶である請求項11又は12記載の組成物。

【請求項14】 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品である請求項11、12又は13記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、非還元性糖質とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースなどの非還元性糖質と該非還元性糖質の澱粉からの製造方法、並びに該非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース( $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース)が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレイト・ケミストリー(Advances in Carbohydrate Chemistry)、第18巻、第201乃至225頁(1963年)アカデミック・プレス社(米国)及び『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー(Applied and Environmental Microbiology)、第56巻、第3213乃至3215頁(1990年)などにも記載されて

いるように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースのような非還元性糖質は、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、含アミノ酸物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭50-154485公報で報告されている微生物菌体を用いる方法や、特開昭58-216695公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物菌体を用いる方法は、該菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当り15w/w%（以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を単に%と略称する）未満と低く、その上、これを抽出、精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼ及びトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いず

れもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っていない。

【0004】これに関係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁（1992年）、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント（Dextrose Equivalent, DE）として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の

特性は、DEの大小に依存しており、還元性澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】還元性澱粉部分分解物とDEとの関係を断ち切る唯一の方法は、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などによって、その還元基を糖アルコールに変換して非還元性糖質にする方法である。しかし、この方法は、高圧オートクレーブを必要とし、多量の水素やエネルギーを消費するのみならず、防災上からも高度な安全施設や管理を必要としている。その上、得られる還元性澱粉部分分解物の糖アルコールは、原料の還元性澱粉部分分解物がグルコースのみからなるのに対し、グルコースとソルビトールとから構成される点で異なり、それを摂取することによって、一過性ではあるが、難消化、緩下の症状を起こす懸念もある。従って、還元性澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変換することなく、その還元力を低減若しくは消滅させる方法の確立が望まれる。

【0008】これを解決するために、本発明者等は、先に、特願平5-349216号明細書で、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素（本酵素を、本明細書を通じて、非還元性糖質生成酵素と称する。）を開示し、本非還元性糖質生成酵素を利用して、還元性澱粉部分分解物から分子末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質とこれを含む低還元性糖質並びにこれら糖質からのトレハロースの製造方法を確立した。

【0009】しかしながら、この方法で得られる低還元性糖質は、原料の還元性澱粉部分分解物が比較的高分子の場合には、その還元力をよく低減しているものの粘度が高すぎるきらいがあり、また、原料の還元性澱粉部分分解物が比較的低分子の場合には、還元力の低減が不充分であることが判明した。また、このようにして得られた低還元性糖質にグルコアミラーゼを作用させて生成されるトレハロースは、原料の還元性澱粉部分分解物からの収量が、工業的に生産するにはあまりに低すぎることも判明した。これらを改善するためには、還元性澱粉部分分解物から更に低分子の非還元性糖質をより高収量で製造する方法の確立が望まれる。

【0010】また、本発明者等は、特願平6-79291号明細書で、分子の末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する新規トレハロース遊離酵素（本酵素を、本明細書を通じて、トレハロース遊離酵素と称する。）を開示し、前述の非還元性糖質生成酵素と本トレハロース遊離酵素とを併用して還元性澱粉部分分解物から比較的高収量の

トレハロースの製造方法を確立した。しかしながら、トレハロースを工業的に大量生産するには、その収量を更に向上させる製造方法の確立が望まれる。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安価で安定供給の容易な澱粉を原料として、比較的低分子の分子末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質（以下、本物質を、本明細書では、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースと称する。）、トレハロースの両グルコースに重合度1若しくは2以上のグルコースを有している非還元性糖質、換言すれば、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質（以下、本物質を、本明細書では、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドと称する。）及びトレハロースなどの非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を高収量で製造する方法を確立し、併せて、これら糖質の用途を提供するものである。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題を解決するために、澱粉を原料に非還元性糖質の製造方法について鋭意研究を続けてきた。その結果、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させるに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを併用することにより目的を達成し得ることを見だし、本発明を完成した。

【0013】すなわち、澱粉を比較的低DEに液化した溶液、望ましくは、DE15未満の溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させて $\alpha$ -グリコシルトレハロース、又は、これを含む低還元性糖質を製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをともに作用させて得られる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、非還元性糖質生成酵素だけを作用させた場合と比較して、その還元性をほとんど増加させることなく、その分子量を著しく低減し、粘度を低下し、その取扱いを容易にすることが判明した。更に、このようにして得られた低還元性糖質にグルコアミラーゼを作用させたところ、その構造中に含まれるトレハロース含量が大幅に増加していることも判明した。また、澱粉を比較的低DEに液化した溶液、望ましくはDE15未満の溶液に非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させてトレハロースを製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをともに作用させて得られるトレハロースは、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを作用させた場合と比較して、その収量が大幅に増加することが判明した。このようにして得られる非還元性糖質やこれを含む低還元性糖質は、安定性が高く、取扱い容易で、広範な用途に利用でき、例えば、飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に

利用できる。

【0014】まず、本発明で用いる非還元性糖質生成酵素としては、澱粉を比較的低DEに液化した溶液に含まれるグルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する酵素であればよく、例えば、特願平5-349216号明細書に開示されるリゾビウム属、アルスロバクター属、プレビバクテリウム属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属及びテラバクター属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性の非還元性糖質生成酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平6-166011号明細書で開示したスルフォロブス属由来の耐熱性非還元性糖質生成酵素を用いることも有利に実施できる。また、トレハロース遊離酵素としては、澱粉を液化した溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させて生成される $\alpha$ -グリコシルトレハロースを、そのトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する酵素であればよく、例えば、特願平6-79291号明細書に開示されているリゾビウム属、アルスロバクター属、プレビバクテリウム属、及びマイクロコッカス属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性のトレハロース遊離酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平6-166126号明細書で開示したスルフォロブス属に属するトレハロース遊離酵素を用いることも有利に実施できる。微生物から非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を調製する方法は、これら酵素の産生能を有する微生物を培養して調製すればよい。

【0015】微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を産生し得る栄養培地であればよく、合成培地及び天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化し得る物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、還元性澱粉部分分解物などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸、又はその塩も使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、還元性澱粉部分分解物の場合には、通常、20%以下が望ましく、菌の生育及び増殖からは5%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物及び、例えば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガニン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ

酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0016】培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好氣的に行われる。また、耐熱性酵素を産生する微生物の場合には、通常、温度40乃至90℃、好ましくは50乃至80℃、pH2乃至10、好ましくはpH3乃至9から選ばれる条件で行われる。培養時間は微生物が増殖し得る時間以上の時間であればよく、好ましくは10時間乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、また、フエメンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養又は連続培養のいずれでもよい。

【0017】このようにして、微生物を培養した後、酵素を回収する。酵素活性は、培養物の菌体及び除菌液いずれにも認められ、菌体及び除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸塩析法、アセトン及びアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【0018】更に、除菌液及びその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破碎法、ガラスビーズ及びアルミナによる機械的破碎法、フレンチプレスによる破碎法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離又は膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0019】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、東ソー株式会社製『DEAE-トヨパール』などを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、同社製『ブチルトヨパール』などを用いた疎水カラムクロマトグラフィー、同社製『ト

ヨパール HW-55』などを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一な酵素を得ることができる。

【0020】このようにして得られる非還元性糖質生成酵素は、一般的には、例えば、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

(5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。

【0021】非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v% (50mMリン酸緩衝液、pH7.0) 4mlに酵素液を1ml加え40℃で60分間反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に脱イオン水で10倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義した。

【0022】また、前述のようにして得られるトレハロース遊離酵素は、一般的には、例えば、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

$\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

(4) 至適温度

10

20

30

40

50

pH 7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

(5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

(6) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。

【0023】トレハロース遊離酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトトリオシルトレハロース (別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシル  $\alpha$ -D-グルコシド) 1.25w/v% (50mMリン酸緩衝液、pH 7.0) 4mlに酵素液を1ml加え40℃で30分間反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を1単位と定義する。

【0024】次に、本発明で用いる澱粉枝切酵素は、澱粉を比較的低DEに液化した溶液、望ましくは、DE 15未満の液化溶液に作用し、澱粉の枝分かれ結合を加水分解する酵素であって、公知のプルラナーゼ、イソアミラーゼなどが有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。また、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼは、澱粉を比較的低DEに液化した溶液、望ましくは、DE 15未満の液化溶液に作用し、澱粉糖を糖転移し、不均化 (disproportionation) 反応する酵素であって、公知のバチルス属、クレブシーラ属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。

【0025】また、前述の澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼに加えて、必要に応じて、他のアミラーゼ、望ましくは、澱粉を比較的低DEに液化した溶液に作用して、主としてグルコース重合度3以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ、マルトヘプタオース生成アミラーゼなどを用いることも有利に実施できる。

【0026】本発明で使用される澱粉は、とうもろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。澱粉を液化するには、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは濃度10%以上、更に望ましくは約20乃至50%とし、これを加熱して機械的に液化しても、酸又は酵素で液化してもよい。液化の程度は、比較的低いものが適しており、望ましくはDE 15

未満、更に望ましくはDE 10未満のものが好適である。酸で液化する場合には、例えば、塩酸、磷酸、硝酸などで液化し、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで必要pHに中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、 $\alpha$ -アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型 $\alpha$ -アミラーゼの使用が適している。

【0027】このようにして得られる澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるには、これら酵素が作用し得るpH、温度で行えばよく、通常、pH 4乃至10、好ましくは、pH 5乃至8、温度約10乃至80℃、好ましくは、約30乃至70℃で行われる。また、澱粉を液化した溶液にこれら酵素を加える順序は問わず、いずれかの酵素を先に加え、他の酵素をその後に加えて作用させることも、また、これら酵素を同時に加えて作用させることも随意である。

【0028】酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよいが、通常、基質である澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる。このようにして得られる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、澱粉を液化した溶液に、澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼが非還元性糖質生成酵素又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに作用するため、比較的低分子の $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び/又は $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドを多量に含有するか、又はトレハロースを多量に含有する特長を有している。なお、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドは、本出願人が、特願平6-54377号明細書で開示した $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドを含む呼称である。

【0029】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコール及びアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、酵母での発酵処理、アル

カリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法を1種又は2種以上組み合わせて精製することにより、最高純度の非還元性糖質製品を得ることも容易である。

【0030】とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、目的物の含量を向上させた非還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0031】このようにして得られた本発明の分子中にトレハロース構造を有する非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、又は $\alpha$ -グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。

【0032】とりわけ、本発明の分子中にトレハロース構造を有する非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性又は低還元性糖質にグルコアミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶又は無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0033】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約60%以上、濃度約65乃至90%のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、必要に応じて、0.1乃至20%の種晶共存下で、温度95℃以下、望ましくは10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスキットからトレハロース含水結晶又はこれを含む含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0034】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜(母液)とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、

より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度70乃至85%、晶出率20乃至60%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60乃至100℃の熱風で乾燥し、次いで30乃至60℃の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分10乃至20%、晶出率10乃至60%程度のマスキットを約0.1乃至3日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0035】また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で50乃至160℃、望ましくは80乃至140℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0036】このようにして製造される本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いもの場合には、良質で上品な甘味を有している。

【0037】更に、アミラーゼ、例えば、すい臓由来 $\alpha$ -アミラーゼにより分解し、低分子非還元性オリゴ糖や低分子マルトオリゴ糖を生成し、また、これらオリゴ糖も、 $\alpha$ -グルコシダーゼや小腸酵素でも容易に分解し、グルコース及びトレハロースを生成し、更に、生成したトレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫菌誘発菌などによって、醗酵されにくく、虫菌を起こしにくい甘味料としても利用できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0038】また、本発明のトレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。また、安定な甘味料であることにより、結晶高含有製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用す

10

20

30

40

50



ることも有利に実施できる。

【0039】さらに、本発明のトレハロースは、保湿剤、増量剤、増粘剤などとして化粧用クリーム、ヘアリンズ、乳液、化粧水などに使用され、その際、トレハロースとともに、例えば、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポリオキシエチレンオレイルアルコールなどの保湿剤と併用することも、更には、 $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸、酵素処理ルチンなどのビタミン類を配合して、水分保持効果に優れ、紫外線によるシミやソバカスを防

止する効果、美白効果も期待される化粧品としても有利に実施できる。

【0040】また、無水結晶トレハロースの場合には、食品、医薬品、化粧品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としても有利に利用でき、安定で高品質の粉末、顆粒、錠剤など固状物を容易に製造することができる。

【0041】従って、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤、脱水剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0042】本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0043】また、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0044】また、本発明の非還元性糖質、又はこれを含む低還元性糖質は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0045】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、

焼肉のタレ、カレーウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0046】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろ、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、コーヒー、紅茶、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席するこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0047】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。

【0048】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンIIなどのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエ

チン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、スプレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【0049】以上述べたような各種組成物に非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

【0050】次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0051】まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ M-11及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素について説明し、次いで、公知微生物からの非還元性糖質生成酵素について説明する。

#### 【0052】

【実験1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からの非還元性糖質生成酵素の生産】マルトース2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%及び水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0053】容量301のファーメンターに種培養の場合と同組成の培地約201を入れて滅菌、冷却して温度30℃とした後、種培養液1w/v%を接種し、温度30℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、約24時間通気攪拌培養した。培養液の本酵素活性は約1.5単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には約0.6単位/mlの酵素活性が、また、培養液上清には約0.9単位/mlの酵素活性が認められた。

#### 【0054】

【実験2 酵素の精製】実験1で得られた培養液約181を超高圧菌体破碎装置、大日本製薬株式会社製『ミニラボ』で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離(10,000rpm、30分間)することにより、約161の上清を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離して上清を回収した。

【0055】更に、その液に飽和度0.6になるように硫酸を溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(360ml)を2回に分けて、『DEAE-トヨパール』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。

【0056】本酵素は『DEAE-トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。得られる酵素活性画分を、2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、得られる上清を東ソー株式会社製『ブチルトヨパール 650』を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。吸着した本酵素を硫酸2Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムから溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、『トヨパールHW-55』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行い、酵素活性画分を回収した。精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

#### 【0057】

#### 【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	26,800		100
破砕後の上清	20,300	0.10	78
硫酸塩析後の透析液	16,100	0.32	60
イオン交換カラム溶出液	11,300	5.5	42
疎水カラム溶出液	5,730	98	21
ゲル濾過溶出液	3,890	195	15

【0058】表1の工程でゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0059】

【実験3 酵素の性質】実験2で得られた精製酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約77,000乃至87,000ダルトンであった。

【0060】精製酵素標品を2%アンフォライン含有ポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.6乃至4.6であった。

【0061】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響は活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で、40℃付近、至適pHは、40℃、60分間反応で、約7.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷

した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(温度安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は40℃付近まで安定であり、pH安定性は約6乃至9であった。

#### 【0062】

【実験4 非還元性糖質の調製】基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、又はマルトヘプタオースの20%水溶液を調製し、それぞれに実験2で得られた精製酵素を基質固相物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、和光純薬工業株式会社製『ワコービーズ WB-T-330』を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。高速液体クロマトグラフィーは、室温下で行い、溶離液として水を流速0.5ml/分で流し、示差屈折計、東ソー株式会社製『RI-8012』で分析した。その結果を表2に示す。

#### 【0063】

#### 【表2】

基質	反応物	HPLC 流出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	PI	23.3	35.0
	マルトトリオース	25.9	65.0
マルトテトラオース	PII	21.6	85.6
	マルトテトラオース	24.1	14.4
マルトペンタオース	PIII	19.7	92.7
	マルトペンタオース	22.6	7.3
マルトヘキサオース	PIV	18.7	93.5
	マルトヘキサオース	21.4	6.5
マルトヘプタオース	PV	17.8	93.4
	マルトヘプタオース	21.0	6.6

(注) 表中、PI、PII、PIII、PIV、PVは、それぞれの基質、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースから新たに生成した糖質を意味する。

【0064】表2の結果から明らかなように、反応物中には残存するそれぞれの基質と新たに生成したそれぞれの糖質PI、PII、PIII、PIV、PVからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されない。それぞれの生成率はグルコース重合度3のPIが比較的低いものの、グルコース重合度4以上のPII、PIII、PIV、PVは85%以上の高い生成率であることが判明した。なお、グルコース、マルトースからは、新たな糖質を生成しないことが判明した。

【0065】それぞれの反応物から新たに生成した糖質を精製するため、脱色、脱塩、濃縮後、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂、東京有機化学工業株式会社製『XT-1016』（架橋度4%）を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、新たに生成した糖質含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を真空乾燥し、それぞれ高純度糖質標品を調製した。基質原料に対する収率は、固形物換算で、それぞれPIで約9%、PIIで約65%、PIIIで約82%、PIVで約80%、PVで約77%であった。その純度は、それぞれPIで97.5%、PIIで98.6%、PIIIで99.5%、PIVで98.4%、PVで98.4%であった。

【0066】またこれらの新たに生成した高純度糖質標

品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定し、DEで表した。結果は表3にまとめた。

【0067】

【表3】

糖質標品	純度 (%)	DE
PI	97.5	0.83
PII	98.6	0.35
PIII	99.5	0.10
PIV	98.4	0.27
PV	98.4	0.23

【0068】表3の結果から明らかなように、いずれの標品にも僅かな還元力しか認めなかった。その僅かな還元力は、その標品中に微量に混入、残存している基質由来の還元性マルトオリゴ糖に起因するものと推定され、新たに生成した糖質はいずれも実質的に非還元性であると判断される。

【0069】

【実験5 メイラード反応】実験4において調製した糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVの10%とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、それぞれの原料であるマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオー

ス、マルトヘキサオース、又はマルトヘプタオースを用いて、同様に、処理し、480nmにおける吸光度を測定した。それらの結果を表4に示す。

【0070】

【表4】

糖質標品	着色度 (480nm)	判定
PI	0.027	本発明
PII	0.018	本発明
PIII	0.012	本発明
PIV	0.016	本発明
PV	0.015	本発明
マルトトリオース	0.623	対照
マルトテトラオース	0.475	対照
マルトペンタオース	0.369	対照
マルトヘキサオース	0.318	対照
マルトヘプタオース	0.271	対照

【0071】表4の結果から明らかなように、新たに生成した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVのいずれもメイラード反応による着色度は極めて低く、それぞれ原料の基質であるマルトオリゴ糖の着色度の僅かに3乃至6%程度であり、本発明の新規酵素によって生成する非還元性糖質はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが半明した。

【0072】

【実験6 グルコアミラーゼによる酵素分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV又は、PVのそれぞれ50mgを、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶解し、1単位のグルコアミラーゼ(生化学工業株式会社製)を加え、40℃で6時間保ち、酵素分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分解物を分析したところ、いずれの標品からも分解物としてグルコースとトレハロースのみが検出された。検出されたグルコース含量、トレハロース含量、その組成モル比の結果を表5に示す。

【0073】

【表5】

糖質標品	グルコース (%)	トレハロース (%)	組成モル比 (グルコース/トレハロース)
PI	36.2	63.8	1.07
PII	52.0	48.0	2.08
PIII	61.4	38.6	3.02
PIV	68.3	31.7	4.09
PV	72.9	27.1	5.11

【0074】表5の結果から明らかなように、グルコアミラーゼにより、非還元性糖質PIはグルコース1分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIはグルコース2分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIIはグルコース3分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIVはグルコース4分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PVはグルコース5分子とトレハロース1分子に分解されることが半明した。

【0075】また、グルコアミラーゼの反応特性を考慮すると、これら非還元性糖質の構造はトレハロース分子にグルコース分子が $\alpha$ -1, 4-結合、もしくは $\alpha$ -1, 6-結合で結合した糖質で、それぞれ、PIはトレハロース1分子にグルコース1分子が結合したグルコース重合度3の非還元性糖質で、PIIはトレハロース1分子にグルコース2分子が結合したグルコース重合度4の非還元性糖質で、PIIIはトレハロース1分子にグルコース3分子が結合したグルコース重合度5の非還元性糖質で、PIVはトレハロース1分子にグルコース4分子が結合したグルコース重合度6の非還元性糖質で、PVはトレハロース1分子にグルコース5分子が結合し

たグルコース重合度7の非還元性糖質であると判断される。なお、同様に、非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVに $\beta$ -アミラーゼを作用させたところ、非還元性糖質PI、PIIは分解されず、PIIIはマルトースの1分子とPIの1分子に分解され、PIVはマルトースの1分子とPIIの1分子に分解され、PVはマルトースの2分子とPIの1分子に分解されることが半明した。

【0076】以上の結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素による反応は、基質の低分子化及び高分子化を伴わない、換言すれば、グルコース重合度の変化を伴わない、分子内変換反応と判断され、また、この非還元性糖質生成酵素によって生成した非還元性糖質、PI、PII、PIII、PIV及びPVは、それぞれ、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースで示される $\alpha$ -グリコシルトレハロース( $G_n-T$ ;但し、Gはグルコース残基を意味し、nは1以上の整数を意味し、Tは $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを意味する。)であると判断される。

## 【0077】

【実験7 各種の酵素による分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVのそれぞれを基質として、ブタすい臓由来 $\alpha$ -アミラーゼ（シグマ社販売）、コメ由来 $\alpha$ -グルコシダーゼ（同社販売）、又はラット小腸アセトン粉末酵素（同社販売）のそれぞれに作用させた後、分解物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーで分析した。 $\alpha$ -アミラーゼの反応は、それぞれの基質10mgを、50mMリン酸緩衝液（pH6.9）1mlに溶解し、これに、酵素活性1単位加え、37℃で18時間保って行っ

た。 $\alpha$ -グルコシダーゼの反応は、50mM酢酸緩衝液（pH4.0）を用いた以外、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。ラット小腸アセトン粉末酵素の場合も、50mMマレイン酸緩衝液（pH6.0）を用いた以外、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。 $\alpha$ -アミラーゼによる分解物の糖組成を以下の表6に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成を以下の表7、表8に示す。

## 【0078】

【表6】

糖質標品	$\alpha$ -アミラーゼによる分解物の糖組成 (%)				
	PI	PII	G3	G2	G1
PI	97.3	0	2.3	0.4	0
PII	0	98.8	0.4	0.8	0
PIII	61.0	4.8	0	33.0	1.2
PIV	47.2	3.3	40.4	7.5	1.6
PV	10.2	44.9	35.3	8.8	1.0

（注）表中、G3はマルトトリオースを、G2はマルトースを、G1はグルコースを意味する。

## 【0079】

【表7】

糖質標品	$\alpha$ -グルコシダーゼによる分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
PI	36.5	63.0	0.5
PII	52.1	47.6	0.3
PIII	61.7	38.1	0.2
PIV	68.5	30.2	0.3
PV	71.4	28.3	0.3

## 【0080】

【表8】

糖質標品	ラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
PI	37.2	62.4	0.4
PII	52.5	47.1	0.4
PIII	62.0	37.6	0.4
PIV	68.8	30.8	0.4
PV	73.4	26.5	0.1

【0081】表6の結果から明らかなように、糖質標品、PI及びPIIは、 $\alpha$ -アミラーゼによりほとんど分解されないものの、糖質標品、PIII、PIV、及びPVは $\alpha$ -アミラーゼにより低分子のオリゴ糖、PI、PII、マルトトリオース、マルトース及びグルコースにまで分解されることが判明した。

【0082】また、表7、表8の結果から明らかなよう

に、糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVいずれも $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により、実験6のグルコアミラーゼの場合と同様に、グルコースとトレハロースにまで分解されることが判明した。

【0083】また、同様に $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素によって分解されたそれぞれの

反応物に、更に、1単位のブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社販売）を加え、pH5.7、37℃で18時間作用させ、高速液体クロマトグラフィー法で糖組成を分析したところ、糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVいずれの場合も、 $\alpha$ -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により生成したトレハロースはトレハラーゼによりグルコースにまで分解することが判明した。

【0084】上述のように、

(1) 非還元性糖質生成酵素は、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から、そのグルコース重合度を変化することなく、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成している。

(2) 非還元性糖質PVは、 $\alpha$ -アミラーゼにより、主に非還元性糖質PIIとマルトトリオースを生じ、非還元性糖質PIIは、グルコアミラーゼにより、トレハロース1分子とグルコース2分子を生じている。これらの結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素は、還元性澱粉部分分解物の還元性末端を非還元性のトレハロース構造に分子内変換する全く新しい作用機作の酵素であると判断される。

【0085】

【実験8 急性毒性】7週齢のdd系マウスを使用し、実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、

PII、PIII、PIV、及びPVを経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、これら非還元性糖質はいずれも低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、それらのLD<sub>50</sub>値は、いずれも50g/kg以上であった。

【0086】

【実験9 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERM BP-4316) を用いた以外は、実験1と同様にファーメンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は、約1.2単位/mlであった。実験1と同様にして菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、それぞれ約0.5単位/ml及び約0.7単位/mlであった。

【0087】

【実験10 酵素の精製】実験9の方法で得られた培養液約18lを用いて、実験2と同様に精製した。精製の各工程結果は表9にまとめた。

【0088】

【表9】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	21,800		100
破碎後の上清	17,500	0.14	81
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.41	73
イオン交換カラム溶出液	12,600	8.5	58
疎水カラム溶出液	8,820	98	41
ゲル濾過溶出液	5,290	201	24

【0089】表9の工程で、ゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品を、実験2の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0090】

【実験11 酵素の性質】実験10で得られた精製酵素標品を、実験3の場合と同様に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約76,000乃至86,000ダルトンであった。また、本精製酵素標品の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、pI約3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、及び本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験3の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響

を図5に、pHの影響を図6に、温度安定性を図7に、pH安定性を図8に示した。

【0091】図から明らかなように酵素の至適温度は40℃付近、至適pHは約6.5乃至7.0である。温度安定性は40℃付近までであり、pH安定性は約6.0乃至9.5である。

【0092】

【実験12 非還元性糖質の調製】実験10で得られた精製酵素標品を用いて、実験4及び実験6の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成することが判明した。

## 【0093】

【実験13 公知微生物からの非還元性糖質生成酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明の非還元性糖質生成酵素産生能の確認された表10に示す特定の微生物を、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) ATCC19420の場合に37℃で培養した以外は、実験1の場合と同様にファーメンターで27℃で72時間培養し

た。それぞれの培養液約181を用いて、実験2の場合と同様に、培養液を破碎装置にかけ、その上清を硫酸塩析、透析し、更にイオン交換カラムにかけ、部分精製酵素標品を得、その性質を調べた。結果を表10にまとめた。

## 【0094】

## 【表10】

微生物名	イオン交換カラム 流出液 (単位)	至適温度	至適pH	温度安定性	pH安定性
Brev. h.	2,700	35℃付近	約6.5	35℃付近まで	約5.5乃至11
Flav. a.	216	35℃付近	約6.5乃至6.9	35℃付近まで	約8.0乃至9.5
Micr. l.	1,730	35℃付近	約6.4乃至6.8	35℃付近まで	約6.5乃至8.0
Micr. r.	1,340	35℃付近	約6.8乃至7.2	35℃付近まで	約6.0乃至11
Curt. c.	1,200	30℃付近	約6.4乃至6.8	35℃付近まで	約6.5乃至7.8
Myc. s.	358	35℃付近	約6.5	35℃付近まで	約6.0乃至9.0
Terr. t.	1,050	35℃付近	約6.5乃至7.0	35℃付近まで	約6.0乃至9.5
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	11,300	40℃付近	約7.0	40℃付近まで	約6.0乃至9.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	12,600	40℃付近	約6.5乃至7.0	40℃付近まで	約6.0乃至9.5

(注) 表中、微生物名の略記は、下記の微生物を意味する。

Brev. h.: *Brevibacterium helvolum* ATCC11822  
 Flav. a.: *Flavobacterium aquatile* IF03772  
 Micr. l.: *Micrococcus luteus* IF03084  
 Micr. r.: *Micrococcus roseus* ATCC186  
 Curt. c.: *Curtobacterium citreum* IF015231  
 Myco. s.: *Mycobacterium smegmatis* ATCC19420  
 Terr. t.: *Terrabacter tumescens* IF012960

【0095】また、これら公知菌由来の部分精製酵素を用いて、実験12の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認を行ったところ、いずれの酵素もリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成することが半明した。

【0096】次に、新規微生物リゾビウム・スピーシー

ズ M-11及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素について説明し、次いで、公知微生物からのトレハロース遊離酵素について説明する。

## 【0097】

【実験14 リゾビウム・スピーシーズ M-11からのトレハロース遊離酵素の生産】澱粉部分分解物、松谷化学工業株式会社製『パインデックス#4』2.0w/



v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%及び水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0098】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて殺菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1w/vを接種し、温度27℃、pHは6.0乃至8.0に保ちつつ、約72時間通気攪拌培養した。

【0099】培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.5単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約2単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.6単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.8単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.9単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約1.2単位/ml認められた。

#### 【0100】

【実験15 酵素の精製】実験14の方法で得られた培養液約18lを超高圧菌体破碎装置『ミニラボ』で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離(10,000rpm、30分間)することにより、約16lの遠心上清液を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離(10,000rpm、30分間)することにより上清を回収した。

【0101】更に、その液に硫酸を飽和度0.6になる

ように溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離し、不溶物を除いた。その透析液(360ml)を2回に分けて、『DEAE-トヨパール』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。

【0102】本発明のトレハロース遊離酵素、非還元性糖質生成酵素とも『DEAE-トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから異なる食塩濃度においてそれぞれ溶出した。『DEAE-トヨパール』からの溶出パターンを図9に示す。非還元性糖質生成酵素は食塩濃度約0.2Mで、トレハロース遊離酵素は食塩濃度約0.3Mで溶出し、それぞれの酵素活性画分を回収し、以下、両酵素を別々に精製した。

【0103】非還元性糖質生成酵素活性画分を2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離し不溶物を除き、得られる上清を『ブチルトヨパール650』を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。吸着した本酵素を2Mから0M硫酸のリニアグラジエントでカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、『トヨパールHW-55』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行い、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。

【0104】トレハロース遊離酵素の精製は、『DEAE-トヨパール』から溶出したトレハロース遊離酵素活性画分を用いて、上記の非還元性糖質生成酵素の精製方法と同様に、2M硫酸を含む緩衝液に対して透析し、次いで疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【0105】精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を、非還元性糖質生成酵素の場合は表11に、本発明のトレハロース遊離酵素の場合は表12に示す。

#### 【0106】

【表11】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	28,500		100
破碎後の上清	22,900	0.12	80
硫酸塩析後の透析液	21,100	0.43	74
イオン交換カラム溶出液	15,200	6.2	53
疎水カラム溶出液	7,950	101	28
ゲル濾過溶出液	5,980	197	21

【表12】

#### 【0107】

工程	トレハロース遊離 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	37,400		100
破砕後の上清	31,500	0.17	84
硫酸塩析後の遊析液	29,200	0.60	78
イオン交換カラム溶出液	25,400	5.3	68
疎水カラム溶出液	18,700	98.5	50
ゲル濾過溶出液	11,600	240	31

【0108】表11及び表12の工程でそれぞれゲル濾過溶出液として得られた、精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0109】

【実験16 トレハロース遊離酵素の性質】実験15の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約58,000乃至68,000ダルトンであった。

【0110】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.3乃至4.3であった。

【0111】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図10(温度の影響)、図11(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、30分間反応で、45℃付近、至適pHは、40℃、30分間反応で、約6.0乃至7.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図12(温度安定性)、図13(pH安定性)に示した。本酵素の熱安定性は約40℃付近までであり、pH安定性は約5乃至10であった。

#### 【0112】

【実験17  $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製】基質として用いる $\alpha$ -グリコシルトレハ

ロースは、特願平5-349216号明細書に記載する方法に従って調製した。即ち、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースから選ばれる還元性澱粉部分分解物の20%水溶液に実験15の方法で得られた精製非還元性糖質生成酵素標品を基質固形物グラム当たりそれぞれ2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、常法に従って、加熱失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質の高純度標品を調製した。得られた高純度標品のうち、グルコシルトレハロース標品の純度は97.6%で、マルトシルトレハロース標品の純度は98.6%で、マルトトリオシルトレハロース標品の純度は99.6%で、マルトテトラオシルトレハロース標品の純度は98.3%で、マルトペンタオシルトレハロース標品の純度は98.1%であった。

【0113】上記5種の非還元性糖質( $\alpha$ -グリコシルトレハロース)の20%水溶液を調製し、それぞれに実験15で得られた精製トレハロース遊離酵素を基質固形物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、『ワコービーズ W B-T-330』を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。対照として、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースに精製トレハロース遊離酵素を同様に作用させ、高速液体クロマトグラフィーで分析した。それらの結果を表13に示す。

#### 【0114】

#### 【表13】

基質	反応物	HPLC 溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコシル トレハロース	トレハロース	27.4	17.5
	グルコース	33.8	6.5
	グルコシル トレハロース	23.3	76.0
マルトシル トレハロース	トレハロース	27.4	44.3
	マルトース	28.7	44.4
	マルトシル トレハロース	21.6	11.3
マルトトリオシル トレハロース	トレハロース	27.4	39.5
	マルトトリオース	25.9	60.0
	マルトトリオシル トレハロース	19.7	0.5
マルトテトラオシル トレハロース	トレハロース	27.4	34.2
	マルトテトラオース	24.1	65.5
	マルトテトラオシル トレハロース	18.7	0.3
マルトペンタオシル トレハロース	トレハロース	27.4	29.1
	マルトペンタオース	22.6	70.6
	マルトペンタオシル トレハロース	17.8	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	25.9	100
マルトテトラオース	マルトテトラオース	24.1	100
マルトペンタオース	マルトペンタオース	22.6	100
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	21.8	100
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	21.0	100

【0115】表13の結果から明らかなように、

(1) トレハロース遊離酵素は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度が1以上の還元性糖質とを生成する。

(2) マルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけない。

これらの結果から、本発明のトレハロース遊離酵素は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースのトレハロース部分とその他のグリコシル部分との間の結合を極めて特異的に加水分解し、トレハロースを遊離する全く新しい作用機構の酵素であると判断される。

【0116】次いで、それぞれの反応物からトレハロースを精製するため、脱色、脱塩、濃縮し、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を用いたカラム分画を行い、トレハロース含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を濃縮して濃度約

65%にし、25℃で2日間放置して含水トレハロース結晶を晶出させ、分蜜し、真空乾燥して、トレハロース含量99%以上の高純度標品を調製した。原料基質に対するそれぞれの収率は、固形物換算で、グルコシルトレハロースから9.5%、マルトシルトレハロースから14.9%、マルトトリオシルトレハロースから16.0%、マルトテトラオシルトレハロースから18.5%、マルトペンタオシルトレハロースから17.7%であった。得られたそれぞれの高純度トレハロース標品を用いて、市販の試薬トレハロース（和光純薬工業株式会社販売）を標準品として、融点、融解熱、比旋光度、赤外線吸収スペクトル、粉末X線回折パターン及びブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社製）での分解性について比較したところ、調製したすべての高純度トレハロース標品は、融点 $97.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、融解熱 $57.8 \pm 1.2 \text{ KJ/mole}$ 、比旋光度 $+182 \pm 1.1^\circ$ で、試薬トレハロースの実測値とよく一致し、また、赤外線吸収

スペクトル及び粉末X線回折パターンについても、試薬トレハロースのスペクトル又はパターンとよく一致した。更に、ブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社製）によって、高純度トレハロース標品は試薬トレハロースと同様にグルコースに分解された。以上の結果から明らかに、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースに本発明のトレハロース遊離酵素を作用させ生成した糖質はトレハロースであると確認された。

#### 【0117】

【実験18 還元性澱粉部分分解物からのトレハロースの調製】5%ワキシーコーンスターチ懸濁液を加熱糊化させた後、pH4.5、温度50℃に調整し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当り4,000単位の割合になるように加え、20時間反応させた。その反応液をオートクレーブ（120℃、10分間）し、次いで60℃に冷却し、これを東ソー株式会社製『トヨパール HW-50S』を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量750ml）でグ

ルコース重合度35乃至10の還元性澱粉部分分解物を調製した。

【0118】得られた還元性澱粉部分分解物、又はグルコース重合度3のマルトトリオースを、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で1%濃度に調整し、これに実験15の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素標品及び精製トレハロース遊離酵素標品をそれぞれ基質固形物グラム当り4単位の割合で加え、40℃で24時間作用させた後、一部を採り、脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。

【0119】残りの反応液は、更に、50℃、pH4.5に調整した後、グルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製）を基質固形物グラム当り50単位の割合で加え、24時間作用させ、同様に脱塩し、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。それらの結果を表14に示す。

#### 【0120】

【表14】

還元性部分分解物 のグルコース重合度	反応物	組成比 (%)	
		非還元性糖質生成酵素 およびトレハロース 遊離酵素反応後	グルコアミラーゼ反応後
34.1	トレハロース	80.8	83.5
	グルコース	0.2	18.5
	還元性オリゴ糖	14.4	0.0
	グリコシル トレハロース	4.8	0.0
	トレハロース		
26.2	トレハロース	79.7	82.5
	グルコース	0.2	17.5
	還元性オリゴ糖	15.3	0.0
	グリコシル トレハロース	4.8	0.0
	トレハロース		
18.1	トレハロース	77.7	80.7
	グルコース	0.2	19.3
	還元性オリゴ糖	17.0	0.0
	グリコシル トレハロース	5.1	0.0
	トレハロース		
15.2	トレハロース	75.0	78.5
	グルコース	0.3	21.5
	還元性オリゴ糖	18.8	0.0
	グリコシル トレハロース	8.1	0.0
	トレハロース		
10.0	トレハロース	66.1	70.1
	グルコース	0.3	29.9
	還元性オリゴ糖	27.6	0.0
	グリコシル トレハロース	7.7	0.0
	トレハロース		
3 (マルト トリオース)	トレハロース	4.2	20.8
	グルコース	2.1	79.2
	マルトトリオース	85.0	0.0
	グリコシル トレハロース	28.7	0.0
	トレハロース		

(注) 表中、グリコシルトレハロースは、末端にトレハロース構造を有する

【0121】表14に示すように、非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させた後のトレハロース生成率は、グルコース重合度3のマルトトリオースでは4.2%と低い値であったが、グルコース重合度10乃至34.1の澱粉部分分解物では66.1乃至80.8%の高い値が得られた。また、原料の還元性澱粉部分分解物のグルコース重合度が高い程、得られるトレハロース純度が高いことも判明した。更に、該両酵素を作用させた反応液にグルコアミラーゼを作用させ、残存するグルコース重合度が3以上の $\alpha$ -グリコシルトレハロースをトレハロースとグルコースとに分解することにより、生成するトレハロース純度がより高まることも判明した。

#### 【0122】

【実験19 メイラード反応】実験17の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)の10%

とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、グルコース、マルトースを用いて、同様に処理し、480nmにおける吸光度を測定した。結果を表15に示す。

#### 【0123】

【表15】

糖質標品	着色度(480nm)
トレハロース(本発明)	0.008
グルコース(対照)	1.671
マルトース(対照)	0.926

【0124】表15の結果から明らかなように、トレハロース標品は、メイラード反応による着色度は僅かであ

り、グルコースやマルトースの着色度の僅か0.4乃至0.6%程度であり、本発明のトレハロース標品はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが半明した。従って、本糖質は、アミノ酸と混合しても、アミノ酸を損なうことが少ない糖質である。

#### 【0125】

【実験20 生体内での利用試験】厚治等が、『臨床栄養』、第41巻、第2号、第200乃至208頁(1972年)で報告している方法に準じて、実験17の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%) 10 30gを20w/v%水溶液とし、これをボランティア6名(健康な26才、27才、28才、29才、30才、31才の男性)にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値及びインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値ともに、投与後、約0.5乃至1時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸收、代謝、利用されて、エネルギー源になることが半明した。

#### 【0126】

【実験21 急性毒性試験】マウスを使用して、実験17の方法で得られた高純度トレハロース標品(純度99.5%)を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD50値は、50g/

kg以上であった。

#### 【0127】

【実験22 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からのトレハロース遊離酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11(FERM BP-4130)に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36(FERM BP-4316)を用いた以外は、実験14と同様に、ファーメンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は約1.3単位/mlで、本発明のトレハロース遊離酵素の酵素活性は約1.8単位/mlであった。実験14と同様にして菌体懸濁液と培養上清との酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.5単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約0.5単位/ml認められ、培養上清には、非還元性糖質生成酵素の酵素活性が約0.8単位/ml、トレハロース遊離酵素の酵素活性が約1.3単位/ml認められた。

#### 【0128】

【実験23 酵素の精製】実験22の方法で得られた培養液約181を用いて、実験15と同様の方法で精製した。精製の各工程結果は非還元性糖質生成酵素の場合は表16に、トレハロース遊離酵素の場合は表17にまとめた。

#### 【0129】

#### 【表16】

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	23,700		100
破碎後の上清	22,400	0.15	95
硫酸塩析後の透析液	20,200	0.51	85
イオン交換カラム溶出液	15,100	8.5	64
疎水カラム溶出液	8,450	115	36
ゲル濾過溶出液	6,120	217	26

#### 【表17】

工程	トレハロース遊離 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
培養液	32,500		100
破碎後の上清	30,100	0.19	93
硫酸塩析後の透析液	25,400	0.72	78
イオン交換カラム溶出液	22,700	22.3	70
疎水カラム溶出液	15,200	215	47
ゲル濾過溶出液	11,600	497	36

#### 【0130】

【0131】表16及び表17の工程で、それぞれゲル 50 濾過溶出液として得られた精製非還元性糖質生成酵素及

び精製トレハロース遊離酵素を、実験15の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた両精製酵素は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0132】

【実験24 酵素の性質】実験23の方法で得られた精製トレハロース遊離酵素を、実験16の場合と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約57,000乃至67,000ダルトンであった。また、本酵素の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、等電点は3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、及び本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験16の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図14に、pHの影響を図15に、温度安定性を図16に、pH安定性を図17に示した。

【0133】図から明らかなように酵素の至適温度は45℃付近、至適pHは約6.0乃至7.5である。温度安定性は45℃付近までであり、pH安定性は約5.0乃至10.0である。

#### 【0134】

【実験25  $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製】実験23の方法で得られた精製酵素を用

いて、実験17の方法に従って、グルコース重合度が3以上の $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0135】

【実験26 公知微生物からのトレハロース遊離酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明のトレハロース遊離酵素産生能の確認されたプレビバクテリウム・ヘロボルムATCC11822及びマイクロコッカス・ロゼウスATCC186を、実験14の場合と同様にファーマンターで27℃で72時間培養した。それぞれの培養液約181を用いて、実験15の場合と同様に、培養液を破碎装置で処理し、その遠心上清を回収し、続いて、硫酸塩析、透析、イオン交換カラムクロマトグラフィーし、得られた部分精製酵素標品の性質を調べた。これらの結果を、前述のリゾビウム・スピーシーズ M-11及びアルスロバクター・スピーシーズ Q36の場合とともに表18にまとめた。

#### 【0136】

##### 【表18】

微生物名	イオン交換カラム 溶出液(単位)	至適温度	至適pH	温度安定性	pH安定性
プレビバクテリウム・ ヘロボルム ATCC11822	6,070	40℃付近	約6.5乃至6.8	40℃付近まで	約5.5乃至9.5
マイクロコッカス・ ロゼウス ATCC186	3,010	35℃付近	約6.8	30℃付近まで	約6.5乃至7.2
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	25,400	45℃付近	約6.0乃至7.5	40℃付近まで	約5.0乃至10.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	22,700	45℃付近	約6.0乃至7.5	45℃付近まで	約5.0乃至10.0

【0137】また、これらの公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験25の方法に従って、グルコース重合度が3以上の $\alpha$ -グリコシルトレハロースからのトレハロースの調製の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来のトレハロース遊離酵素の場合と同様に、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースからトレハロースを遊離することが判明した。

#### 【0138】

【実験27 トレハロース高含有糖質を製造するための澱粉の液化程度と使用酵素の影響】澱粉からトレハロース高含有糖質を製造するために、澱粉の液化程度と使用する酵素の組合わせの影響を調べた。濃度20%のとうもろこし澱粉乳に炭酸カルシウムを0.1%加えてpH

6.5に調整した後、これに $\alpha$ -アミラーゼ、ノボ社販売『ターマミール』を澱粉当たり0.1乃至2.0%を加え、95℃で15分間反応させ、120℃にオートクレーブして10分間保って、DE2.5乃至20.5の液化溶液とし、これを急冷したものに実験2の方法で調製した精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり5単位及び実験15の方法で調製した精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり10単位加え、更に澱粉枝切酵素イソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉グラム当たり500単位及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉グラム当たり5単位加えてpH6.0、45℃で24時間反応させた。本

反応液を95℃、10分間加熱した後、冷却し、次いで、グルコアミラーゼを澱粉グラム当たり10単位加えてpH5.0で10時間反応させた。本反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析し、糖質中のトレハロース含量(%)を求めた。対照として、澱粉液化溶液に非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを同様

に作用させ、同様に、グルコアミラーゼを作用させて、高速液体クロマトグラフィーで分析した。結果は、表19に示す。

【0139】

【表19】

α-アミラーゼ 使用量 澱粉当たり (%)	DE	酵素の組合わせ			
		N+T	N+T	N+T	N+T
			+D	+C	+D +C
0.1	2.5	21.3	79.6	76.2	84.3
0.4	4.8	22.5	69.7	67.7	70.9
0.6	7.8	23.3	63.2	59.1	68.2
1.0	12.5	23.7	56.0	51.3	62.5
1.2	14.8	25.3	50.3	44.7	58.4
1.5	17.3	22.4	44.2	39.2	48.3
2.0	20.5	18.6	38.4	34.9	46.1

(注) 表中、Nは非還元性糖質生成酵素を意味し、Tはトレハロース遊

離酵素を意味し、Dは澱粉枝切酵素を意味し、Cはシクロマルト

デキストリン・グルカノトランスフェラーゼを意味する。

【0140】表19の結果から明かなように、澱粉からトレハロース高含有糖質を製造するには、その液化の程度は比較的低いものが適しており、望ましくは、DE15未満、更に望ましくはDE10未満が好適であることが判明した。また、それに使用する酵素は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素だけを作用させるよりも、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させた方が、澱粉からのトレハロース収量を約2乃至4倍にも向上することとなり、澱粉からトレハロースを工業的に大量生産する上で、極めて有利であることが判明した。

【0141】以下、本発明の非還元性糖質、それを含む低還元性糖質及びトレハロースの製造方法を実施例Aで、非還元性糖質、それを含む低還元性糖質及び／又はトレハロースを含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

【0142】

【実施例A-1】馬鈴薯澱粉を濃度約20%の澱粉乳とし、これに蔭酸を0.3%加えてオートクレーブし、冷却し、炭酸カルシウムでpH6.5に中和して、DE約12の液化溶液を得た。本液化溶液に実験2の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり2単位及びイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)澱粉グラム当たり300単位加え、温度45℃で24時間反応させた、本反応液を95℃に加熱して酵素を失活させた後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従

って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物当たり約90%の収率で得た。本品は、α-グリコシルトレハロースを含むDE約8の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0143】

【実施例A-2】タピオカ澱粉を濃度約25%澱粉乳とし、これにα-アミラーゼ、ナガセ生化学工業株式会社製『ネオスピターゼ』を澱粉グラム当たり0.2%加え、85乃至90℃で約20分間反応させ、次いで120℃にオートクレーブし、急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実験9の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり5単位、プルナーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉グラム当たり100単位及びマルトテトラオース生成アミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり5単位加え、pH6.5、温度40℃で36時間反応させた。本反応液を、実施例A-1と同様に、加熱して酵素を失活させた後、精製し、濃度約60%に濃縮した。本濃縮液を原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に



充填し、直列につなぎ樹脂層長全長20mとした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.2で流して分画し、非還元性糖質高含有のグルコース重合度4乃至6の画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当たり約63%の収率で得た。本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロースを含むDE5.4の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用

#### 【0144】

【実施例A-3】とうもろこし澱粉を濃度約30%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム0.1%加え、pH6.5に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ、ノボ社製『ターマイル60L』を澱粉グラム当たり0.3%加え、95℃で15分間反応させ、次いで120℃にオートクレープし、急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実験2の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり4単位、イソアミラーゼを澱粉グラム当たり300単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉グラム当たり5単位加え、pH6.3、温度45℃で48時間反応させた。本反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、これに $\beta$ -アミラーゼを澱粉グラム当たり10単位加えてpH5.5、温度55℃で16時間反応させた。本反応液を、加熱して酵素を失活させた後、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約70%のシラップを固形物当たり約90%の収率で得た。本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドなどの非還元性糖質を含む低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0145】

【実施例A-4】実施例A-3の方法で得たシラップを濃度約55%にして原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、実施例A-2の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行って、非還元性糖質高含有のグルコース重合度3乃至6の画分を採取し、精製、濃縮し、噴霧乾燥して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当たり38%の収率で得た。本品は、本品は、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドなどの非還元性糖質を多量含むDE8の低還元性糖質で、温和で上品な甘味、比較的低粘度、適度な保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0146】

【実施例A-5】とうもろこし澱粉を濃度約30%の澱粉乳とし、これに実施例A-3の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させてDE4の液化溶液を得、次いで、実験2の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり5単位、実験15記載の精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり10単位及びイソアミラーゼを澱粉グラム当たり500単位加え、pH6.0、温度40℃で48時間反応させた。本反応液には、糖組成でトレハロースを76.3%含有していた。本反応液を加熱して酵素を失活させた後、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度約85%にして助晶機にとり、攪拌しつつ徐冷して助晶し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で2日間放置し、晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎してトレハロース含水結晶粉末を、原料の澱粉に対して固形物当たり92%の収率で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0147】

【実施例A-6】タピオカ澱粉を濃度約30%の澱粉乳とし、これに実施例A-2の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させてDE5の液化溶液を得、次いで、実験10の方法で得た精製非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり3単位、実験23の方法で得た精製トレハロース遊離酵素を澱粉グラム当たり5単位及びプルラナーゼを200単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを澱粉グラム当たり3単位加え、pH6.0、温度45℃で48時間反応させた。本反応液には、固形物当たりトレハロースを84.7%含有していた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり約55%の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

#### 【0148】

【実施例A-7】実施例A-6の方法で得た加熱失活した反応液に、グルコアミラーゼを基質グラム当たり10単位加え、pH5.0、温度50℃で10時間反応させた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃度約70%に濃縮した後、助晶機にとり攪拌しつつ徐冷して助晶し、晶出率約40%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm<sup>2</sup>の高圧にて噴霧し、同時に乾燥塔の上部より85℃の熱風を送風し、底部に設けた移送金網コンベ

ア上に結晶粉末を補集した。コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を、原料の澱粉に対して、固形物当たり約87%の収率で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0149】

【実施例A-8】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130)の変異株を実験1の方法に準じて、ファーメンターで約70時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約1001の培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素(約410単位/ml)とトレハロース遊離酵素(約490単位/ml)とを含む濃縮酵素液約51を回収した。とうもろこし澱粉を濃度約33%の澱粉乳とし、これに実施例A-3の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させてDE約4の液化溶液を得、次いで、前記方法で調製した非還元性糖質精製酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当たり0.02ml、イソアミラーゼを澱粉グラム当たり500単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを澱粉グラム当たり5単位加え、pH6.2、温度40℃で48時間反応させた。本反応液を加熱失活し、次いで、グルコアミラーゼを基質グラム当たり10単位加え、pH5.0、温度50℃で10時間反応させた。本反応液には、固形物当たりトレハロースを85.6%含有していた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり64%の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

#### 【0150】

【実施例A-9】実施例A-8の方法で得た反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮して濃度55%のシラップを得た。本糖液を原糖液とし、トレハロース含量を高めるため、カルシウム型強酸性カチオン交換樹脂、ダウケミカル社製『ダウエックス99』(架橋度6%)を用いて、実施例A-2と同様にカラムクロマトグラフィーにかけ、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有画分は、固形物当たりトレハロースを97%含有していた。本高含有画分を、常法に従って、脱色、脱塩精製し、次いで蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約3.0%のシラップとした。次いで

助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当たり1%加え、120℃で攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、100℃で6時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して水分約0.3%の無水結晶トレハロース粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して、固形物当たり約75%の収率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 【0151】

【実施例B-1 甘味料】実施例A-7の方法で得たトレハロース含水結晶粉末1重量部に、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、東洋精糖株式会社販売『 $\alpha$ Gスイート』0.01重量部及びL-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、味の素株式会社販売『アスパルテム』0.01重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約2倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約1/2に低下している。本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

#### 【0152】

【実施例B-2 ハードキャンディー】濃度55%蔗糖溶液100重量部に実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップ30重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出、変形も起こらない高品質のハードキャンディーである。

#### 【0153】

【実施例B-3 チョコレート】カカオペースト40重量部、カカオバター10重量部、蔗糖30重量部、実施例A-8の方法で得た高純度トレハロース含水結晶20重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて50℃で2昼夜練り上げる。この間に、レシチン0.5重量部を加え十分に混和分散させた。次いで、温度調節機で31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、100℃の冷却トンネルを20分間くぐらせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でな

めらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

#### 【0154】

【実施例B-4 チューインガム】ガムベース3重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部及び実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末3重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

#### 【0155】

【実施例B-5 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-3の方法で得た非還元性糖質含有シラップ3重量部及び蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

#### 【0156】

【実施例B-6 乳酸菌飲料】脱脂粉乳175重量部、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末80重量部及び特開平4-281795号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末50重量部を水1,200重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部植菌し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

#### 【0157】

【実施例B-7 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-6の方法で得たトレハロース高含有反応液の精製濃縮シラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

#### 【0158】

【実施例B-8 カスタードクリーム】コーンスターチ100重量部、実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部及び食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明

になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

#### 【0159】

【実施例B-9 ういろうの素】米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、蔗糖40重量部、実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末80重量部及びプルラン4重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当りも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

#### 【0160】

【実施例B-10 あん】原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-3の方法で得た非還元性糖質含有シラップ5重量部及び水4重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。

#### 【0161】

【実施例B-11 パン】小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-4の方法で得た非還元性糖質含有粉末1重量部及び無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。本品は、色相、すだちとともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

#### 【0162】

【実施例B-12 ハム】豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部及び硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-4の方法で得た非還元性糖質含有粉末40重量部及び香辛料からなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

#### 【0163】

【実施例B-13 粉末ペプチド】濃度40%食品用大豆ペプチド溶液、不二製油株式会社製『ハイニース』1重量部に、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利

用できる。

#### 【0164】

【実施例B-14 粉末味噌】赤味噌1重量部に実施例A-9の方法で得た無水結晶トレハロース粉末3重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して1個当たり約4gの固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

#### 【0165】

【実施例B-15 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得られる液状卵黄1重量部に対して、実施例A-9の方法で得た無水結晶トレハロース粉末4重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

#### 【0166】

【実施例B-16 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末2重量部、 $\alpha$ -グリコ

POE(20)POP(2)セチルアルコールエーテル	1重量部
シリコーンKF96(20CS)(信越化学)	2重量部
流動パラフィン	3重量部
プロピレングリコール	5重量部
グリセリン	1重量部
実施例A-7で得られたトレハロース	1重量部
エチルアルコール	15重量部
カルボキシビニルポリマー	0.3重量部
ヒドロキシプロピルセルロース	0.1重量部
2-アミノメチルプロパノール	0.1重量部
POEヒマシ油	0.1重量部
$\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸	1重量部
赤色106号	0.0001重量部
防腐剤	適量
香料	0.1重量部
蒸留水	70重量部

本品は $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸を含む乳液であり、美白効果、安定性、香料の保留効果に優れている。

ソルビトール	2重量部
実施例A-8で得られたトレハロース	0.5重量部
プラセンタリキッド	0.5重量部

シル ルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 【0167】

10 【実施例B-17 ヘアリンス】実施例A-6の方法で製造したトレハロース1重量部、 $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸(株式会社林原生物化学研究所製造)2重量部、酵素処理ルチン、東洋精糖株式会社製『 $\alpha$ グルチン』2重量部、塩化ジステアリルメチルアンモニウム2重量部、セタノール2重量部、シリコンオイル2重量部及びポリオキシエチレンオレイルアルコールエーテル1重量部及び適量の香料を加熱溶解し、これに1,3-ブチレングリコール3重量部、精製水89重量部及び適量の防腐剤からなる混合物を攪拌しながら加え、冷却した後、放置してヘアリンスを得た。本品は、 $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸と酵素処理ルチンとを配合したヘアリンスであり、ヒト及び動物の発育毛促進やフケ、カユミ、抜毛の治療、予防に有利に使用することができる。

#### 【0168】

【実施例B-18 乳液】次の処方にしたがって、常法により乳液を製造した。

#### 【0169】

【実施例B-19 化粧水】次の処方にしたがって、常法により化粧水を製造した。

ソルビトール	2重量部
実施例A-8で得られたトレハロース	0.5重量部
プラセンタリキッド	0.5重量部

53

$\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸  
ジメチルステアリルアミノキシド  
ラウリル硫酸ナトリウム  
エチルアルコール  
防腐剤  
香料  
蒸留水

54

0.5重量部  
0.05重量部  
0.01重量部  
20重量部  
適量  
適量  
7.5重量部

本品は $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸を含む化粧水であり、美白効果、安定性、安全性に優れていた。

## 【0170】

【実施例B-20 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス0.5重量部に実施例A-9の方法で得た無水結晶トレハロース粉末1.5重量部を混捏した後、バットに移し、2日間放置してトレハロース含水結晶に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量のビタミンB1及びビタミンB2粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

## 【0171】

【実施例B-21 固体製剤】ヒト天然型インターフェロ $\alpha$ 標品（株式会社林原生物化学研究所製）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロ $\alpha$ 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロ $\alpha$ を吸着させ、安定剤であるウシ血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロ $\alpha$ を実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約20倍量の無水結晶マルトース粉末、株式会社林原商事販売『フ

配合

第2リン酸カルシウム	45.0重量部
プルラン	2.95重量部
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5重量部
グリセリン	20.0重量部
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0.5重量部
防腐剤	0.05重量部
実施例A-5の方法で得たトレハロース含水結晶粉末	12.0重量部
マルチトール	5.0重量部
水	13.0重量部

上記の材料を常法に従って混合し、練菌磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練菌磨として好適である。

## 【0174】

【実施例B-24 流動食用固体製剤】実施例A-7の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末500重量部、粉末卵黄270重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.8重量

にて打錠し、1錠（約200mg）当たりヒト天然型インターフェロ $\alpha$ を約150単位含有する錠剤を得た。本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

## 【0172】

【実施例B-22 糖衣錠】重量150mgの素錠を芯剤とし、これに実施例A-8の方法で得た高純度トレハロース含水結晶40重量部、プルラン（平均分子量20万）2重量部、水30重量部、タルク25重量部及び酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約230mgになるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末65重量部、プルラン1重量部及び水34重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢の在る外觀の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

## 【0173】

## 【実施例B-23 練菌磨】

部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネ

ルギー補給用に有利に利用できる。

#### 【0175】

【実施例B-25 輸液剤】実施例A-8の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約10w/v%に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してパイロジェンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度10w/v%で血液と等張で、グルコースの場合の2倍濃度でエネルギー補給できる。

#### 【0176】

【実施例B-26 輸液剤】実施例A-8の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ酸配合物がそれぞれ5w/v%、30w/v%になるように水に混合溶解し、次いで実施例B-25と同様に精製してパイロジェンフリーとし、更に、プラスチック製バックに充填し施栓して製品を得た。

アミノ酸配合物の組成 (mg/100ml)

L-イソロイシン	180
L-ロイシン	410
L-リジン塩酸塩	620
L-メチオニン	240
L-フェニルアラニン	290
L-スレオニン	180
L-トリプトファン	60
L-バリン	200
L-アルギニン塩酸塩	270
L-ヒスチジン塩酸塩	130
グリシン	340

本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

#### 【0177】

【実施例B-27 外傷治療用膏薬】実施例A-5の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末200重量部及びマルトース300重量部に、ヨウ素3重量部を溶解したメタノール50重量部を加え混合し、更に10w/v%プルラン水溶液200重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治療期間が短縮され、創面もきれいに治る。

#### 【0178】

【発明の効果】上記から明らかなように、澱粉から $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシドなどのトレハロース構造を有する非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を製造するに際し、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵

素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させることにより、澱粉からの非還元性糖質の収量を高め、比較的低分子、低粘度で取扱い容易な低還元性糖質となり、その工業的生産を容易にする。また、澱粉からトレハロースを製造するに際し、澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び/又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させることにより、澱粉からのトレハロース収量を著しく高め、その工業的实施を容易にする。このようにして得られる $\alpha$ -グリコシルトレハロース、 $\alpha$ -グリコシル  $\alpha$ -グリコシド及びトレハロースなどの非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質は、安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。とりわけ、トレハロースは非経口的にも使用され、よく代謝利用される。従って、本発明の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0179】本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉から、従来望むべくして容易に得られなかった非還元性糖質、又は、これを含む糖質を工業的に大量かつ安価に提供できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響は、食品、化粧品、医薬品業界は言うに及ばず、農畜産業、化学工業にも及びこれら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図4】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

【図5】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図7】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図8】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

【図9】DEAE-トヨパールからの本発明のトレハロース遊離酵素と非還元性糖質生成酵素の溶出パターンを

示す図である。

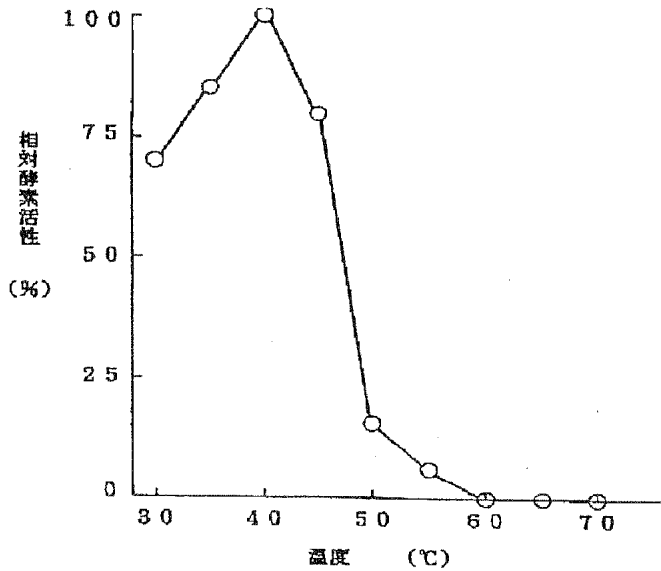
【図10】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-1 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図11】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-1 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

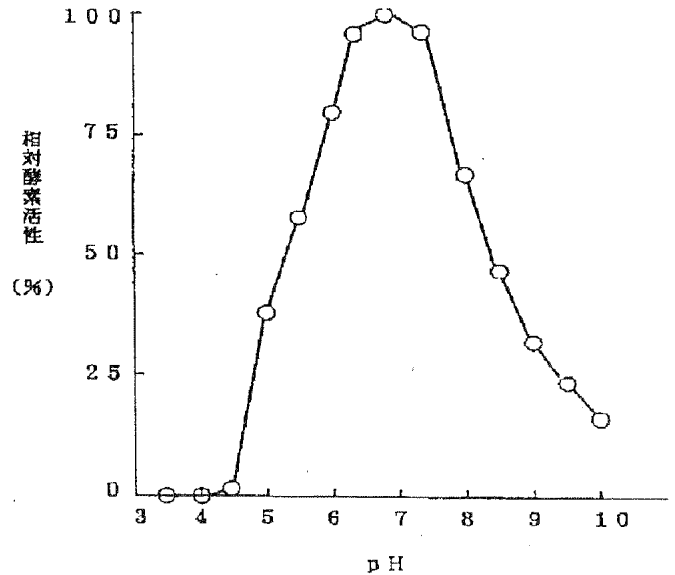
【図12】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-1 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図13】本発明のリゾビウム・スピーシーズ M-1 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

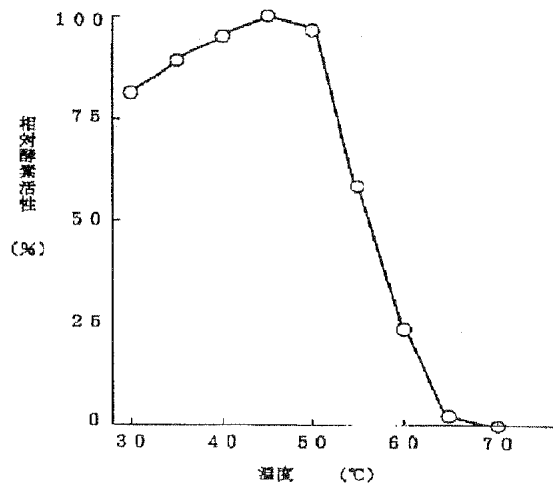
【図1】



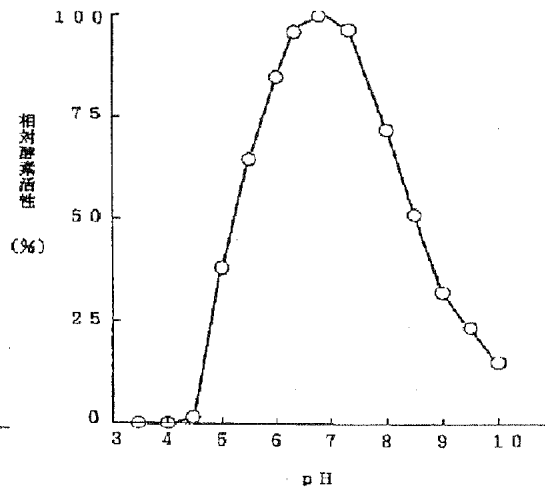
【図2】



【図10】



【図11】



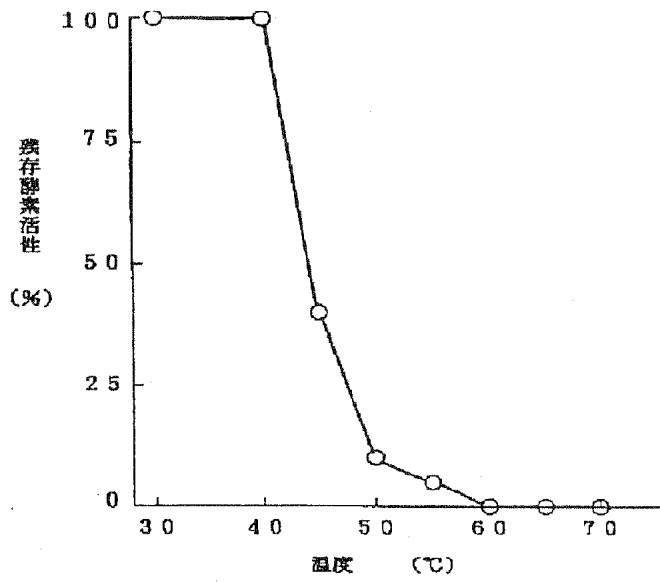
【図14】本発明のアスロバクター・スピーシーズ Q36 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図15】本発明のアスロバクター・スピーシーズ Q36 由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

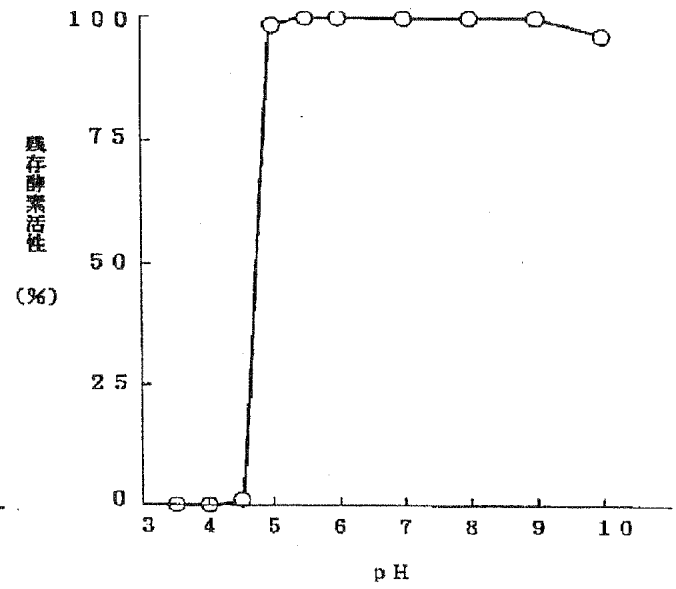
【図16】本発明のアスロバクター・スピーシーズ Q36 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

10 【図17】本発明のアスロバクター・スピーシーズ Q36 由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

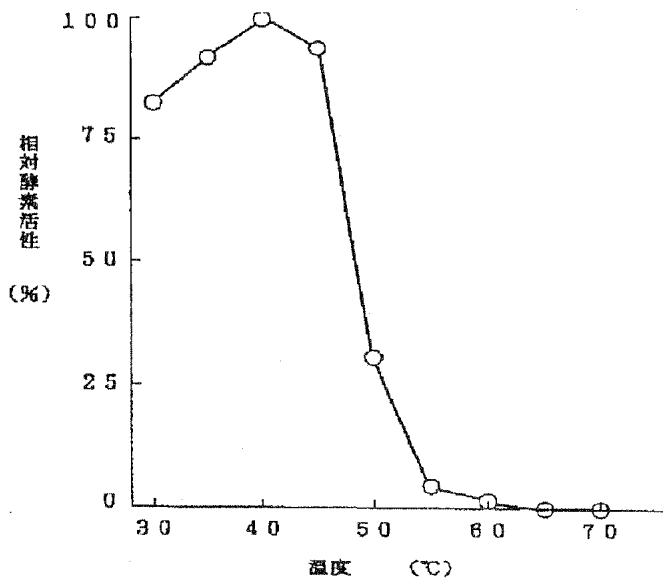
【図3】



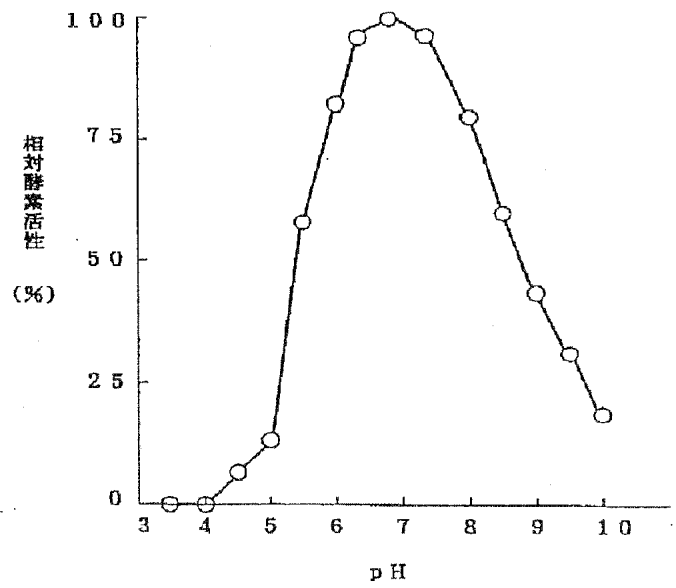
【図4】



【図5】

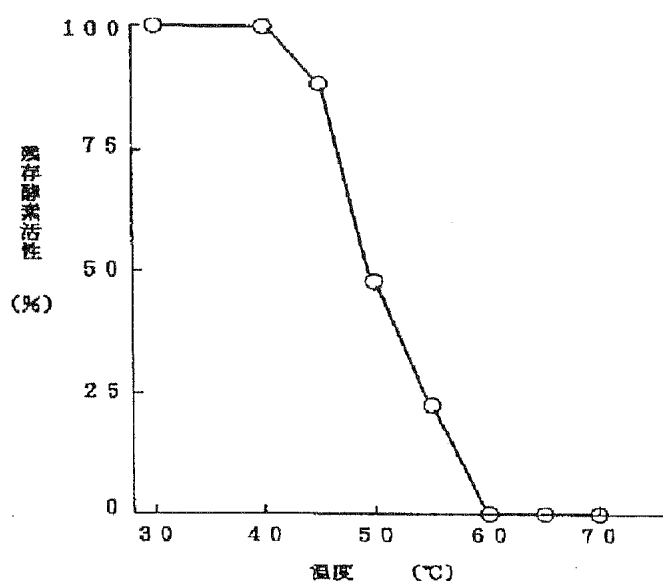


【図6】

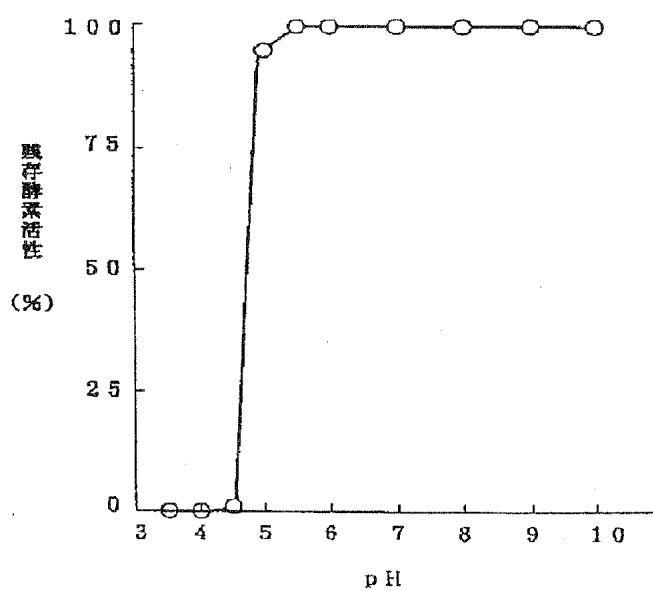




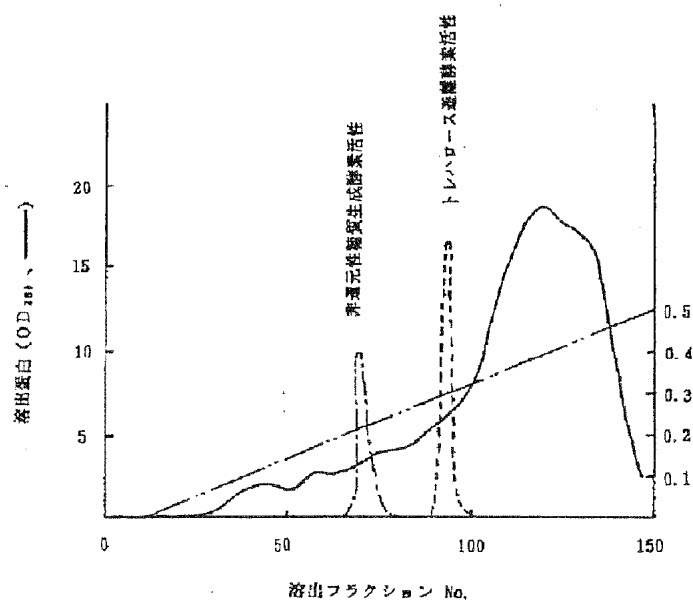
【図7】



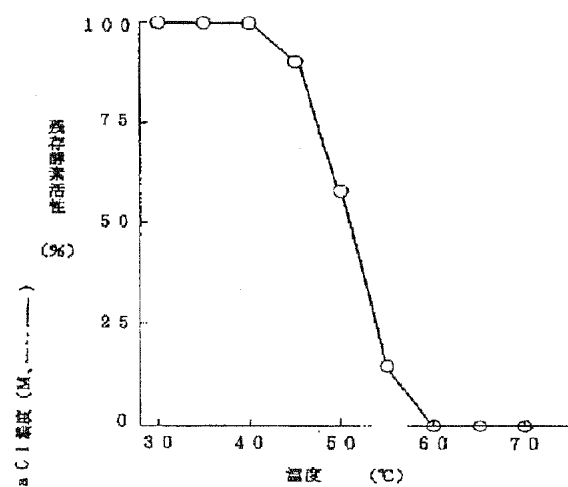
【図8】



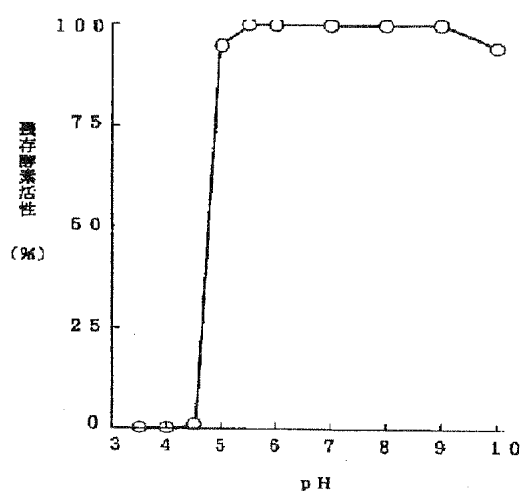
【図9】



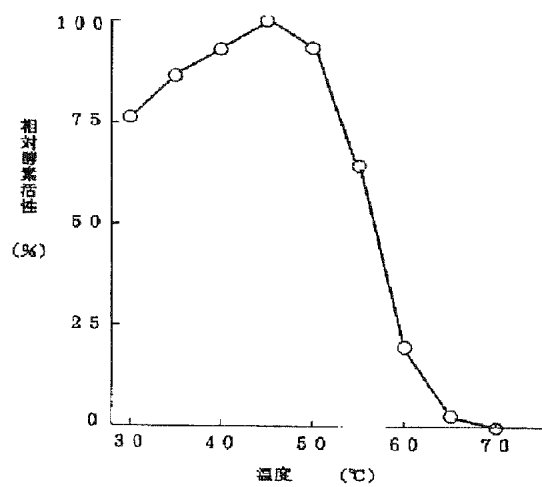
【図12】



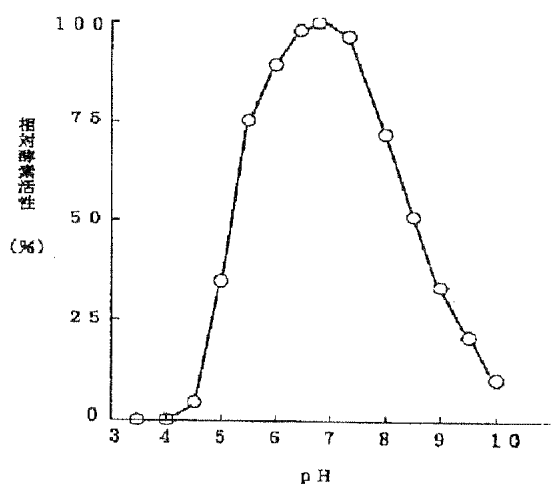
【図13】



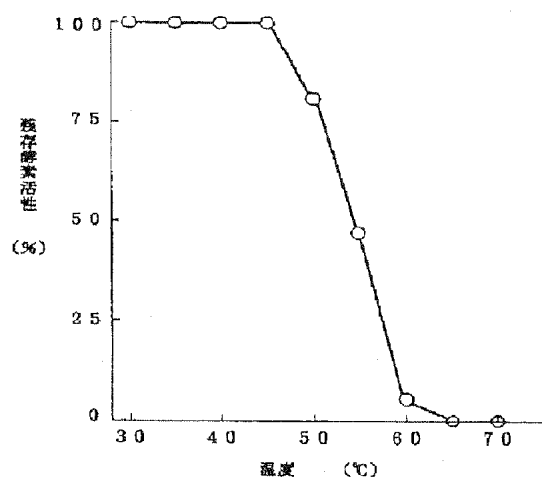
【図14】



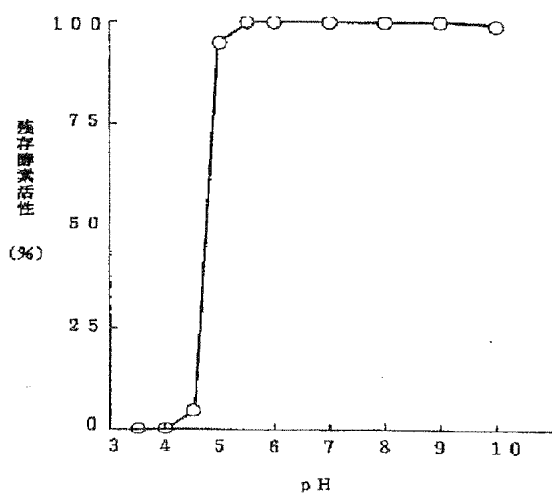
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>  
19/18  
// A23L 1/307

識別記号

庁内整理番号  
7432-4B

F I

技術表示箇所

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第3区分  
 【発行日】平成13年12月18日(2001.12.18)

【公開番号】特開平8-73504  
 【公開日】平成8年3月19日(1996.3.19)  
 【年通号数】公開特許公報8-736  
 【出願番号】特願平7-116583  
 【国際特許分類第7版】

C08B 37/00  
 A23L 1/236  
 A61K 47/36

C12P 19/16  
 19/18

// A23L 1/307

【FI】

C08B 37/00 G  
 A23L 1/236 A  
 A61K 47/36 B  
 D

C12P 19/16  
 19/18  
 A23L 1/307

【手続補正書】  
 【提出日】平成13年6月21日(2001.6.21)

【手続補正1】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】特許請求の範囲  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【特許請求の範囲】

【請求項1】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させ、得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項2】 澱粉を液化した溶液が、濃度10w/w%以上の澱粉をDE15未満に液化した溶液である請求項1記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項3】 澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをグルコース重合度3以上のオリゴ糖を生成するアミラーゼとともに作用させることを特徴とする請求項1又は2記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項4】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求項1、2又は3記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項5】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項4記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項6】 非還元性糖質生成酵素の理化学的性質が、

(1) 作用  
 グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する。

(2) 分子量  
 SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

(3) 等電点  
 アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

(4) 至適温度  
 pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

(5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。  
また、トレハロース遊離酵素の理化学的性質が、

(1) 作用

α-グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

(5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。  
であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項7】 酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる量である請求項1乃至6のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質。

【請求項8】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させて非還元性糖質を生成せしめ、これを採取することを特徴とする非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項9】 澱粉を液化した溶液が、濃度10w/w%以上の澱粉乳を酸又は酵素でDE15未満に液化した溶液である請求項8記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項10】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させるか、又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとともに作用させた後、β-アミラーゼ、グルコアミラーゼ又はα-グルコシダーゼを作用させて非還元性糖質及び夾雑糖質含有溶液とし、これをカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させた非還元性糖質を採取することを特徴とする請求項8又は9記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項11】 カラムクロマトグラフィーが、塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーである請求項10記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項12】 非還元性糖質が、分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、分子の内部にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求項8乃至11のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項13】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項12記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項14】 非還元性糖質生成酵素の理化学的性質が、

(1) 作用

グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物からα-グリコシルトレハロースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

(5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。  
また、トレハロース遊離酵素の理化学的性質が、

(1) 作用

α-グリコシルトレハロースのトレハロース部分とそれ以外のグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解

する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約57,000乃至68,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.3乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、30分間反応で、35乃至45℃付近。

(5) 至適pH

40℃、30分間反応で、pH約6.0乃至7.5。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30乃至45℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.0乃至10.0。であることを特徴とする請求項8乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項15】 酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる量である請求項8乃至13のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法。

【請求項16】 澱粉を液化した溶液に、非還元性糖質生成酵素、又は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させて非還元性糖質を製造するに際し、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをともに作用させて非還元性糖質を製造することを特徴とする非還元性糖質の増収方法。

【請求項17】 酵素の使用量が、澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる量である請求項16記載の非還元性糖質の増収方法。

【請求項18】 請求項1乃至7のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた飲食物。

【請求項19】 非還元性糖質が、カラムクロマトグラフィーにかけて含量を向上させた非還元性糖質である請求項18記載の飲食物。

【請求項20】 非還元性糖質が、トレハロースの含水

結晶又は無水結晶である請求項18又は19記載の飲食物。

【請求項21】 請求項1乃至7のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた化粧品。

【請求項22】 非還元性糖質が、カラムクロマトグラフィーにかけて含量を向上させた非還元性糖質である請求項21記載の化粧品。

【請求項23】 非還元性糖質が、トレハロースの含水結晶又は無水結晶である請求項21又は22記載の化粧品。

【請求項24】 請求項1乃至7のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめた医薬品。

【請求項25】 非還元性糖質が、カラムクロマトグラフィーにかけて含量を向上させた非還元性糖質である請求項24記載の医薬品。

【請求項26】 非還元性糖質が、トレハロースの含水結晶又は無水結晶である請求項24又は25記載の医薬品。

【請求項27】 請求項8乃至15のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法により得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめることを特徴とする飲食物の製造方法。

【請求項28】 請求項8乃至15のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法により得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめることを特徴とする化粧品の製造方法。

【請求項29】 請求項8乃至15のいずれかに記載の非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質の製造方法により得られる非還元性糖質、又は、これを含む低還元性糖質を含有せしめることを特徴とする医薬品の製造方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】これを解決するために、本発明者等は、先に、特願平5-349216号明細書（特開平7-143876号公報）で、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から分子の末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素（本酵素を、本明細書を通じて、非還元性糖質生成酵素と称する。）を開示し、本非還元性糖質生成酵素を利用して、還元性澱粉部分分解物から分子末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質とこれを含む低還元性糖質並びにこれら糖質からの

トレハロースの製造方法を確立した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】また、本発明者等は、特願平6-79291号明細書（特開平7-213283号公報）で、分子の末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質のトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する新規トレハロース遊離酵素（本酵素を、本明細書を通じて、トレハロース遊離酵素と称する。）を開示し、前述の非還元性糖質生成酵素と本トレハロース遊離酵素とを併用して還元性澱粉部分分解物から比較的高収量のトレハロースの製造方法を確立した。しかしながら、トレハロースを工業的に大量生産するには、その収量を更に向上させる製造方法の確立が望まれる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】まず、本発明で用いる非還元性糖質生成酵素としては、澱粉を比較的低DEに液化した溶液に含まれるグルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から $\alpha$ -グリコシルトレハロースを生成する酵素であればよく、例えば、特願平5-349216号明細書（特開平7-143876号公報）に開示されるリゾビウム属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ミクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属及びセラバクター属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性の非還元性糖質生成酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平6-166011号明細書（特開平8-66188号公報）で開示したスルフォロブス属由来の耐熱性非還元性糖質生成酵素を用いることも有利に実施できる。また、トレハロース遊離酵素としては、澱粉を液化した溶液に非還元性糖質生成酵素を作用させて生成される $\alpha$ -グリコシルトレハロースを、そのトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する酵素であればよく、例えば、特願平6-79291号明細書（特開平7-213283号公報）に開示されているリゾビウム属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、及びミクロコッカス属などに属する微生物由来の酵素が有利に利用できる。また、必要ならば、耐熱性のトレハロース遊離酵素を用いることも随意であり、例えば、本出願人が特願平6-166126号明細書（特開平8-66187号公報）で開示したスル

フォロブス属に属するトレハロース遊離酵素を用いることも有利に実施できる。微生物から非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を調製する方法は、これら酵素の産生能を有する微生物を培養して調製すればよい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよいが、通常、基質である澱粉を液化した溶液に対して、固形物グラム当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、それぞれ約0.01乃至100単位から選ばれ、また、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至10,000単位から選ばれ、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至500単位から選ばれる。このようにして得られる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、澱粉を液化した溶液に、澱粉枝切酵素及び／又はシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼが非還元性糖質生成酵素又は非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに作用するため、比較的低分子の $\alpha$ -グリコシルトレハロース及び／又は $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ -グリコシドを多量に含有するか、又はトレハロースを多量に含有する特長を有している。なお、 $\alpha$ -グリコシル $\alpha$ -グリコシドは、本出願人が、特願平6-54377号明細書（特開平7-70165号公報）で開示した $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシドを含む呼称である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正内容】

【0149】

【実施例A-8】リゾビウム・スピーシーズ M-11（FERM BP-4130）の変異株を実験1の方法に準じて、ファーメンターで約70時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約1001の培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、非還元性糖質生成酵素（約410単位/ml）とトレハロース遊離酵素（約490単位/ml）とを含む濃縮酵素液約51を回収した。とうもろこし澱粉を濃度約33%の澱粉乳とし、これに実施例A-3の方法に準じて、 $\alpha$ -アミラーゼを作用させてDE約4の液化溶液を得、次いで、前記方法で調製した非還元性糖質生成酵素とトレハロース遊離酵素とを含む濃縮液を澱粉グラム当たり0.02ml、イソアミラーゼを澱粉グラム当たり500単位及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラー

ゼを澱粉グラム当たり5単位加え、pH6.2、温度40℃で48時間反応させた。本反応液を加熱失活し、次いで、グルコミラーゼを基質グラム当たり10単位加え、pH5.0、温度50℃で10時間反応させた。本反応液には、固形物当たりトレハロースを85.6%含有していた。本反応液を加熱失活し、常法に従って、脱色、脱塩して精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得ら

れるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物当たり64%の収率で得た。本品は、極めて純度の高いトレハロース含水結晶であって、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。